

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-311833  
(43)Date of publication of application : 24.11.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/92

(21)Application number : 09-137714  
(22)Date of filing : 13.05.1997

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD  
(72)Inventor : MIKI YUTAKA  
IMASHIYOU NOBUKO  
KOYAMA ISAO  
HANADA TOSHIRO

## (54) METHOD FOR DETERMINATING LDL-CHOLESTEROL

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform a direct determination using an automatic analyzing device without performing a complicated pretreatment operation by performing the determination in the coexistence of an amphoteric surface active agent and cyclodextrin (CD) or its derivative.

SOLUTION: With regard to an amphoteric surface active agent the participation in cholesterol determination reaction of the cholesterol contained in lipoprotein other than LDL is suppressed in the coexistence with CD, for example, an alkyl betaine derivative or the like exists. It is preferably added so as to have a concentration of 0.001-10% (w/v). The CD or its derivative include a polymer of an alkylated CD selected from  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD or the like, for example, 2,6-di-O-methyl-cyclodextrin. It is preferably added so as to have a concentration of 0.001-1% (w/v). The LDL-cholesterol in a biological sample such as serum or blood plasma is determined in the coexistence of the amphoteric surface active agent and the CD or its derivative. Thus, a direct measurement using an automatic analyzing device can be performed.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 10-311833

(43) 公開日 平成10年(1998)11月24日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/92

G 0 1 N 33/92

A

審査請求 未請求 請求項の数 14

F D

(全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平9-137714

(22) 出願日 平成9年(1997)5月13日

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 三木 豊

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業  
株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 今莊 展子

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業  
株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 小山 勲

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業  
株式会社大阪研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LDL-コレステロールの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 低比重リポタンパク (LDL) 中のコレステロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定し得る方法及びそれに用いられる試薬を提供。

【解決手段】 両性界面活性剤と、シクロデキストリン又は／及びその誘導体の共存下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 両性界面活性剤と、シクロデキストリン又は／及びその誘導体の共存下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法。

【請求項2】 コレステロールオキシダーゼ又はコレステロールデヒドロゲナーゼを用いる低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法であって、試料を予めシクロデキストリン又は／及びその誘導体を含んでなる試薬で処理した後、シクロデキストリン又は／及びその誘導体と両性界面活性剤の共存下でコレステロールオキシダーゼ又はコレステロールデヒドロゲナーゼを反応させることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法。

【請求項3】 シクロデキストリン又は／及びその誘導体のコレステロール測定時の反応液中の濃度が、0.0001～10% (W/V) である、請求項1又は2に記載の低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法。

【請求項4】 コレステロール測定時の反応液中の両性界面活性剤濃度が、0.0001～10% (W/V) である、請求項1～3に記載の低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法。

【請求項5】 両性界面活性剤と、シクロデキストリン又は／及びその誘導体とを含有させてなることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項6】 シクロデキストリン又は／及びその誘導体を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ、ベルオキシダーゼ、両性界面活性剤及びコレステロールエステラーゼの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項7】 両性界面活性剤が第一試薬に含まれている、請求項6に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項8】 両性界面活性剤が第二試薬に含まれている、請求項6に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項9】 コレステロールエステラーゼが第一試薬に含まれている、請求項6～8に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項10】 コレステロールエステラーゼが第二試薬に含まれている、請求項6～8に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項11】 コレステロールエステラーゼが第一試薬及び第二試薬の両方に含まれている、請求項6～8に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項12】 シクロデキストリン又は／及びその誘

導体、両性界面活性剤及びコレステロールエステラーゼを含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ及びベルオキシダーゼの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項13】 カップラーとデベロッパの一方が第一試薬に含まれ、他方が第二試薬に含まれている、請求項6～12に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項14】 シクロデキストリン又は／及びその誘導体、両性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、及びカップラー（又はデベロッパ）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ベルオキシダーゼ、及びデベロッパ（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを組み合わせることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キット。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】本発明は、血清、血漿などの生体試料中に存在する低比重リポタンパク（以下、LDLと略記する。）中のコレステロールの測定方法及びこれに用いる試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】血清中の脂質の主な成分はコレステロール、トリグリセライド、リン脂質等であり、これら血清脂質はアポタンパクと結合してリポタンパクを形成し血中を循環する。該リポタンパクは比重の差により高比重リポタンパク（HDL）、LDL、超低比重リポタンパク（VLDL）カイロミクロン（CM）等に分類される。これらリポタンパクのうち、HDLは組織に沈着した過剰なコレステロールを肝臓へ運搬する作用があり、抗動脈硬化作用を有し、一方、LDLは肝臓から各組織へのコレステロールの主たる運搬体であり、LDLの増加は動脈硬化発生と密接な関係があると考えられている。従って、LDL中のコレステロール（以下、LDL-Cと略記する。）は、動脈硬化症、虚血性心疾患（冠動脈疾患）の危険因子と考えられ、該LDL-Cの含有量は、これら疾患の診断・治療および予防の重要な指標となる。

【0003】従来、LDL-Cの測定法としては、沈澱法、超遠心法、電気泳動法、算出式による算出法等が知られている。これら従来法のうち、沈澱法、超遠心法及び電気泳動法は、沈澱・遠心分離処理、超遠心分離処理或いは電気泳動処理により、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離する前処理工程が必要であるため、操作が煩雑であり、現在、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置だけで直接測定

を実施することができないという問題点を有している。  
また、フリーデワルド (Friedewald) の式で知られている総コレステロール値、HDL-コレステロール値及びトリグリセライド値から算出する算出法も、トリグリセライドが500mg/dl以上含有する試料を用いた場合には、正確なLDL-コレステロール量を測定することができないという問題点を有している。

【0004】近年、従来法に於ける上記の如き問題点を解消するために、種々の方法が開発されており、例えば特開7-280812号公報に開示された方法もその一つである。即ち、LDLを凝集剤又は/及び抗体を使用して凝集させた後に、LDL以外のリポタンパクに含まれるコレステロールを定量反応に関与しない別の反応系に導いて消去(消費)させた後、界面活性剤又は/及び無機塩類を使用して、凝集させたLDLを定量反応ができる程度に溶解させ、LDL-コレステロールを定量反応に付し該溶液の吸光度を測定するという方法がそれである。

【0005】しかしながら、この方法は、測定時の試薬の形態が3試薬系又は4試薬系となるため、このような試薬形態での測定が可能なく一部自動分析装置にしか適用できず、通常の臨床検査に於いて用いられている2試薬系での測定にしか使用できない自動分析装置を用いては測定を実施することができないという問題点がある。また、この方法では、測定に用いる試薬の数が多くなるため、測定値の再現性が低下するという問題点もあった。

【0006】更に、煩雑な前処理操作なしでLDL-コレステロールを測定する方法として特開昭58-165800号公報に開示されている方法がある。しかしながら、この方法は、試薬中の例えば界面活性剤やコレステロールエステラーゼの使用濃度が限定されるため試薬の調製が煩雑であり、更に測定時のpHや、測定時間間隔等測定条件を厳密に設定しなくてはならず、しかもHDL中のコレステロールもある程度反応することから、動力学的測定、すなわち、レイト・アッセイでしかLDL-コレステロールの測定を行うことができないため、実用的な測定方法とは言い難い方法であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記した如き状況に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、生体試料中のLDL-コレステロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定することを可能とする方法及びそれに用いられる試薬の提供にある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、両性界面活性剤と、シクロデキストリン(以下、CDと略記する。)又は/及びその誘導体の共存下で測定を行うことを特徴とする、LDL-コレステロールの測定方法の発明であ

る。

【0009】また、本発明は、コレステロールオキシダーゼ(以下、CODと略記する。)又はコレステロールデヒドロゲナーゼ(以下、CHDと略記する。)を用いるLDL-コレステロールの測定方法であって、試料を予めCD又は/及びその誘導体を含んでなる試薬で処理した後、CD又は/及びその誘導体と両性界面活性剤の共存下でCOD又はCHDを反応させることを特徴とする、LDL-コレステロールの測定方法の発明である。

【0010】更に、本発明は、両性界面活性剤と、CD又は/及びその誘導体とを含有させてなることを特徴とする、LDL-コレステロール測定用試薬の発明である。

【0011】また、本発明は、CD又は/及びその誘導体を含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ、ベルオキシダーゼ(以下、PODと略記する。)、両性界面活性剤及びコレステロールエステラーゼ(以下、CHEと略記する。)の夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれているLDL-コレステロール測定用試薬の発明である。

【0012】更にまた、本発明は、CD又は/及びその誘導体、両性界面活性剤及びCHEを含んでなる第一試薬と、COD及びCHEを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ及びPODの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれているLDL-コレステロール測定用試薬の発明である。

【0013】また、本発明は、CD又は/及びその誘導体、両性界面活性剤、CHE、及びカップラー(又はデベロッパ)を含んでなる第一試薬と、COD、CHE、POD、及びデベロッパ(又はカップラー)を含んでなる第二試薬とを組み合わせることを特徴とする、LDL-コレステロール測定用キットの発明である。

【0014】即ち、本発明者等は、LDL-コレステロールを、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別するための前処理操作なしに直接自動分析装置で測定し得る方法を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、生体試料中のLDL-コレステロールの測定を、両性界面活性剤と、CD又は/及びその誘導体の共存下で行えば、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別することなくLDL中のコレステロールを特異的に測定することが可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0015】本発明に於いて用いられる、両性界面活性剤としては、CDと共存させた場合に、LDL以外のリポタンパクに含有されているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制する作用を有するものであればよく、特に限定されない。このような両性界面活性剤の具体例としては、例えばアルキルベタイン誘

導体（例えばラウリルベタイン、ステアリルベタイン、ラウリルジメチルアンモニウムベタイン、ココナットベタイン、ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン、ラウリン酸アミドプロピルベタイン等）、イミダゾリニウムベタイン誘導体（例えばラウリルカルボキシメチルヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-アルキル-N-カルボキシエチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等）、スルホベタイン誘導体（例えばN-オクチル-N、N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-デシル-N、N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-ドデシル-N、N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-テトラデシル-N、N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-ヘキサデシル-N、N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸等）等のベタイン誘導体、例えばアルキルグリシン、アルキルジ（アミノエチル）グリシン、ジオクチルポリアミノエチルグリシン、N-アルキルポリアミノエチルグリシン、 $\beta$ -アラニン誘導体等のアミノカルボン酸誘導体、例えばビス（2-ウンデシル、N-ヒドロキシエチルイミダゾリン）クロル酢酸錯体、アルキルイミダゾリン誘導体等のイミダゾリン誘導体、例えばラウリルジメチルアミノキサイド等のアミノキサイド誘導体等が挙げられる。尚、これら両性界面活性剤は、市販のものをを用いても良いし、公知の方法に準じて合成したものをを用いても良い。これら両性界面活性剤の使用濃度としては、CDと共存させた場合に、LDL以外のリポタンパクに含有されるコレステロールがコレステロール測定反応に参与するのを抑制し得る濃度であればよく、特に限定されないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度、即ち最終の反応液中の濃度が通常0.0001~10% (W/V)、好ましくは0.001~1% (W/V) となるように添加される。また、例えば、本発明の方法を2試薬系測定法により実施する場合の各試薬中の両性界面活性剤の使用濃度としては、試料、第一試薬及び第二試薬の液量比等により異なるため一概には言えないが、第一試薬のみに両性界面活性剤を含有させる場合の第一試薬中の両性界面活性剤濃度としては、通常0.0002~20% (W/V)、好ましくは0.002~2% (W/V) の範囲から適宜選択される。また、第二試薬のみに両性界面活性剤を含有させる場合の第二試薬中の両性界面活性剤濃度としては、通常0.0002~20% (W/V)、好ましくは0.002~2% (W/V) の範囲から適宜選択される。更に、第一試薬及び第二試薬の両方に界面活性剤を含有させる場合の各試薬中の界面活性剤濃度としては、第一試薬中の濃度が、通常0.0001~20% (W/V)、好ましくは0.001~2% (W/V)、第二試薬

中の濃度が、通常0.0001~20% (W/V)、好ましくは0.001~2% (W/V) となるように夫々添加される。尚、これら両性界面活性剤は、単独で用いても、或いは二種以上適宜組み合わせ用いても何れにてもよい。

【0016】本発明に於いて用いられる、CD又は/及びその誘導体としては、両性界面活性剤と共存させた場合に、LDL以外のリポタンパクに含有されているコレステロールがコレステロール測定反応に参与するのを抑制する作用を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD及びこれらCDの誘導体のなかから適宜選択された、前述の如き性質を有するものが挙げられる。このようなCD誘導体の具体例としては、例えば2, 6-ジ- $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 6-ジ- $\alpha$ -エチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -エチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 6-ジ- $\alpha$ -メチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -メチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 6-ジ- $\alpha$ -エチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -エチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 6-ジ- $\alpha$ -メチル- $\gamma$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -メチル- $\gamma$ -シクロデキストリン、2, 6-ジ- $\alpha$ -エチル- $\gamma$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -エチル- $\gamma$ -シクロデキストリン等のアルキル化CD、例えば2-ヒドロキシエチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- $\alpha$ -シクロデキストリン、3-ヒドロキシプロピル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 3-ジヒドロキシプロピル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシエチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、3-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 3-ジヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシエチル- $\gamma$ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- $\gamma$ -シクロデキストリン、3-ヒドロキシプロピル- $\gamma$ -シクロデキストリン等のヒドロキシアリキル化CD、例えば2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -アセチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -アセチル- $\beta$ -シクロデキストリン、2, 3, 6-トリ- $\alpha$ -アセチル- $\gamma$ -シクロデキストリン等のアシル化CD、例えば6- $\alpha$ -D-グルコシル- $\alpha$ -シクロデキストリン、6- $\alpha$ -D-グルコシル- $\alpha$ -シクロデキストリン、6- $\alpha$ -D-グルコシル- $\beta$ -シクロデキストリン、6- $\alpha$ -D-グルコシル- $\gamma$ -シクロデキストリン、6- $\alpha$ -D-グルコシル- $\gamma$ -シクロデキストリン等の糖修飾CD、例えばO-カルボキシメチル- $\alpha$ -シクロデキストリン、O-カルボキシメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、O-

カルボキシメチル- $\gamma$ -シクロデキストリン等のカルボキシルキル化CD、例えばポリ- $\alpha$ -シクロデキストリン、ポリ- $\beta$ -シクロデキストリン、ポリ- $\gamma$ -シクロデキストリン等のポリマー体等が挙げられる。尚、これらCD及びCD誘導体は、市販のものを用いても良いし、例えば米国特許第3453258号明細書、米国特許第3453259号明細書、Polymer Journal, Vol. 13, No. 8, p. 777-781 (1981)、特開昭61-266401号公報、特開昭63-122701号公報、特開昭62-243602号公報等の自体公知の方法に準じて合成したものを用いても良い。また、これらCD又は/及びその誘導体の使用濃度としては、両性界面活性剤と共存させた場合に、LDL以外のリポタンパクに含まれているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制し得る濃度であればよく、特に限定されないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度、即ち最終の反応液中の濃度が通常0.0001~10% (W/V)、好ましくは0.001~1% (W/V) となるように添加される。また、例えば、本発明の方法を2試薬系測定法により実施する場合の第一試薬中のCD又は/及びCD誘導体の使用濃度としては、試料、第一試薬及び第二試薬の液量比等により異なるため一概には言えないが、通常0.0002~20% (W/V)、好ましくは0.002~2% (W/V) となるように添加される。尚、これらCD又はその誘導体は単独で用いても、或は二種以上適宜組み合わせ用いても何れにてもよい。

【0017】本発明の測定法は、上記した如き両性界面活性剤と、CD又は/及びその誘導体とを共存させる以外は、自体公知のコレステロール測定法に準じて、実施すれば良く、使用される試薬類もこれら自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。即ち、血清、血漿等の生体試料中のLDL-コレステロールを、両性界面活性剤と、CD又は/及びその誘導体の共存下、自体公知のコレステロール測定法に準じて測定することにより、生体試料中のLDL-コレステロールを特異的に測定することができる。

【0018】これら自体公知のコレステロール測定法としては、生体試料中のコレステロールを測定し得る自体公知のコレステロール測定法は全て挙げられるが、酵素反応を利用する、例えば試料中のコレステロールエステルをCHEによって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共に、CODによって酸化して、コレステ-4-エン-3-オンと過酸化水素にし、PODの存在下、生成した過酸化水素で被酸化性呈色試薬を酸化発色させて、生じた酸化色素を比色定量する酸化呈色法、例えば試料中のコレステロールエステルをCHEによって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共にCHDの存在下NAD(P)と反応させて、生成するNAD(P)Hを340nmで測定する紫外測定法等が好ましく挙げられる。

【0019】本発明の測定法に用いられるCODは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、ノカルディア属、シュドモナス属等の微生物に由来するもの、牛脾臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。CODの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~10u/ml、好ましくは0.1~2u/mlの範囲から適宜選択される。

【0020】本発明の測定法に用いられるCHEは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、キャンディダ属、シュドモナス属等の微生物に由来するもの、牛脾臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。CHEの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~10u/ml、好ましくは0.1~2u/mlの範囲から適宜選択される。

【0021】本発明の測定法に用いられるPODは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、西洋ワサビ、大根等の植物に由来するもの、カビ、酵母等の微生物に由来するもの、動物の白血球、甲状腺等に由来するもの等は全て使用可能である。PODの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50u/ml、好ましくは0.1~5u/mlの範囲から適宜選択される。

【0022】本発明の測定法に用いられる被酸化性呈色試薬としては、PODの存在下、過酸化水素と反応して呈色するものであれば何れにても良いが、4-アミノアンチピリン(4-AA)等のカップラー及び、該カップラーと酸化縮合して色素を生ずるデベロッパ-との組合せ、即ち、例えば4-AAとフェノール系化合物、ナフトール系化合物若しくはアニリン系化合物との組合せ、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとアニリン系化合物との組合せ等や、例えば2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)、トリフェニルメタン系ロイコ色素、ジフェニルアミン誘導体、ベンジジン誘導体、トリアリルイミダゾール誘導体、ロイコメチレンブルー誘導体、o-フェニレンジアミン誘導体等の酸化によってそれ自体が発色する発色剤等が挙げられる。デベロッパ-としてのフェノール系化合物の具体例としては、例えばフェノール、p-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノール等が挙げられ、ナフトール系化合物の具体例としては、例えば1-ナフトール、1-ナフトール-2-スルホン酸、1-ナフトール-2-カルボン酸等が挙げられ、また、アニリン系化合物の具体例としては、例えばN, N-ジエチルアニリン、N-エチル-N-( $\beta$ -ヒドロキシエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシ-4-フ

ルオロアニリン (FDAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (HDAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン (TOOS)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニル-エチレンジアミン (EMSE) 等が挙げられる。カップラーとデベロッパーとの組合せを用いる場合、カップラーの使用量としては、用いるカップラーの種類や組み合わせるデベロッパーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~100mM、好ましくは0.1~10mMの範囲から適宜選択され、カップラーとして4-AAを使用する場合の使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50mM、好ましくは0.1~5mMの範囲から適宜選択される。また、デベロッパーの使用量としては、用いるデベロッパーの種類や組み合わせるカップラーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50mM、好ましくは0.1~5mMの範囲から適宜選択される。トリフェニルメタン系ロイコ色素の具体例としては、例えばロイコマラカイトグリーン、ビス(p-ジエチルアミノフェニル)-2-スルホフェニルメタン、ビス(p-ジエチルアミノフェニル)-3, 4-ジスルホプロポキシフェニルメタン・ジナトリウム塩等が挙げられ、ジフェニルアミン誘導体の具体例としては、例えばビス[4-ジ(2-ブトキシエチル)アミノ-2-メチルフェニル]アミン、N, N-ビス(4-ジエチルアミノ-2-メチルフェニル)-N'-p-トルエンスルホニル尿素等が挙げられ、また、ロイコメチレンブルー誘導体の具体例としては、例えば10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン・ナトリウム塩、10-[3-(メトキシカルボニルアミノメチル)フェニルメチルアミノカルボニル]-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等が挙げられる。更に、ベンジジン誘導体の具体例としては、例えばベンジジン、o-トリジン、o-ジアニシジン、3, 3'-ジアミノベンジジン、3, 3', 5, 5'-テトラアミノベンジジン等が挙げられ、トリアリルイミダゾール誘導体の具体例としては、例えば2-(4-カルボキシフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4, 5-ビス(4-ジエチルアミノフェニル)イミダゾール、2-(3-メトキシ-4-ジエチルアミノフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4, 5-ビス(2-メチル-4-ジエチルアミノフェニル)イミダゾール等が挙げられる。これら発色剤の使用量としては、通常この分野で用いられる濃度範囲から適宜選択される。

【0023】本発明の測定法に用いられるCHDは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、ノカルディア属に由来するもの等が使

用可能である。CHDの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.1~100u/ml、好ましくは1~50u/mlの範囲から適宜選択される。

【0024】本発明の測定法に用いられるNAD(P)は、特に限定されず、通常この分野で使用されているものは全て使用可能である。NAD(P)の使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~50mM、好ましくは0.1~10mMの範囲から適宜選択される。

【0025】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、両性界面活性剤と、CD又は/その誘導体とを使用する以外は、上記した如き自体公知のコレステロール測定法に使用される試薬類、例えば酸化呈色法に於いて使用されるCOD、CHE、POD、被酸化性呈色試薬等の試薬類、例えば紫外部測定法に於いて使用されるCHE、CHD、NAD(P)等の試薬類を、この分野で使用される濃度範囲で含有するように調製されたものであり、構成要件の好ましい態様或使用濃度等は、上で述べた通りである。

【0026】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、1試薬系測定法用として調製されたものでも2試薬系測定法用として調製されたものでも又それ以上に分けたものでも何れにてもよく、特に限定されない。尚、2試薬以上の試薬に分けた場合には、特異性、測定精度等の点を考慮すると、以下のような組成としておくことが望ましい。即ち、先ず、酸化呈色法用の試薬の場合、第一試薬にCD又は/及びその誘導体を、第二試薬にCODを含有させておくことが望ましく、これ以外の両性界面活性剤、CHE、POD等の酵素類、カップラー及びデベロッパー等は少なくとも何れかの試薬に含まれていればよい。また、紫外部測定法用の試薬の場合、第一試薬にCD又は/及びその誘導体を、第二試薬にCHDを含有させておくことが望ましく、これ以外のNAD(P)等は少なくとも何れかの試薬に含まれていればよい。

【0027】本発明の方法を、2試薬系測定法により実施する場合には、試料とCOD又はCHDを反応させる前に、試料とCD又は/及びその誘導体を含んでなる第一試薬とを混合する等して試料を第一試薬で処理した後、該CD又は/及びその誘導体の存在下で、第二試薬に含有させたCOD又はCHDを反応させる方が、特異性、測定精度等の点から望ましい。

【0028】例えば酸化呈色法の場合、上記した如き試薬の組合せとしては、例えば以下の如きものが挙げられる。

(i) CD又は/及びその誘導体、及び両性界面活性剤を含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパー、

POD及びCHEの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(ii) CD又は／及びその誘導体、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ、POD及び両性界面活性剤の夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(iii) CD又は／及びその誘導体、両性界面活性剤、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ及びPODの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。また、例えば紫外部測定法の場合、上記した如き試薬の組合せとしては、例えば以下の如きものが挙げられる。

(i') CD又は／及びその誘導体、及び両性界面活性剤を含んでなる第一試薬と、CHDを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)及びCHEの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(ii') CD又は／及びその誘導体、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHDを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)及び両性界面活性剤の夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(iii') CD又は／及びその誘導体、両性界面活性剤、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHDを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。尚、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬を2液法用として調製する場合には、両性界面活性剤又は／及びCHEを、CD又は／及びその誘導体と共に第一試薬に含有させて用いる方が、LDL-コレステロールへの特異性及びLDL-コレステロールの測定精度を向上させる上で望ましい。また、上記の如き本発明の試薬の組合せのうち、両性界面活性剤とCHEとを共存させる場合には、両性界面活性剤によりCHE活性の安定性が低下する可能性があるので、試薬の保存安定性等の点から、第一試薬及び第二試薬の両方にCHEを含有させたもの、即ち、酸化呈色法用試薬の場合には、CD又は／及びその誘導体、両性界面活性剤、及びCHEを含んでなる第一試薬と、COD及びCHEを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ及びPODの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるものが、また、紫外部測定法用試薬の場合には、CD又は／及びその誘導体、両性界面活性剤、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHD及びCHEを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるものが、夫々望ましい。また、上記した如き本発明の

酸化呈色法用試薬の組合せに於いては、試薬の安定性(試薬盲検の安定性)を考慮すると、カップラーとデベロッパの一方を第一試薬に含有させ、他方を第二試薬に含有させることが望ましい。

【0029】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、緩衝剤が含まれていても良い。本発明に於いて使用される緩衝剤としては、用いられる各種酵素類及び被酸化性呈色試薬等の組合せ等により異なるが、この分野に於いて通常用いられるものであればよく、pH5~11の範囲で緩衝作用を有するものが使用される。また、これら緩衝剤の使用濃度としては、通常1mM~5M、好ましくは5mM~1Mの範囲から適宜選択される。これら緩衝剤のうち、特にLDL-コレステロールへの特異性の点から、例えばN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(CHES)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ピペラジニ-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)等のアミノエタンスルホン酸誘導体、例えばN-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPSO)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPO)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(HEPPO)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジニ-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)(POPSO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)等のアミノプロパンスルホン酸誘導体、例えばN-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(Tricine)等のグリシン誘導体等のカルボキシル基又はスルホン基を有する脂肪族アミン類を緩衝剤として用いることが望ましい。

【0030】また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、イオン性化合物、例えばデキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、リンタングステン酸等



のポリアニオン等が含まれていても良い。これらは単独または混合して使用することができる。更に、イオン性化合物と、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 等の2価のカチオン（或いはこれら2価のカチオンを生じさせ得る金属塩）とを組み合わせ使用してもよい。これらの使用濃度としては特に限定されないが、イオン性化合物等の使用濃度としては、反応液中の濃度が、通常0.01~10% (w/v) の範囲で使用され、また、2価カチオンの使用濃度としては、反応液中の濃度が、通常0.1~200mMの範囲で使用される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中にはLDL以外のリポタンパク中のコレステロールがコレステロール測定反応に関与することを防止するために、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の1種または2種以上を共存させてもよい。このような目的で使用可能な抗体としては、例えば抗アポリタンパクA抗体、抗アポリタンパクC抗体、抗アポリタンパクE抗体、抗 $\alpha$ リポタンパク抗体等が挙げられる。これら抗体の使用濃度としては、LDL以外のリポタンパク中に含まれるコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを防止し得る濃度以上であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001~10mgAb/ml、好ましくは0.01~1mgAb/mlとなるように反応液中に添加される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、この分野に於いて通常用いられる界面活性剤、例えばポリオキシエチレンソコキシルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリエチレンラウリルエーテル等の非イオン性界面活性剤、例えば塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウム等の陽イオン性界面活性剤、例えばコール酸、デオキシコール酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤等、両性界面活性剤以外の界面活性剤が含まれていてもよい。これらは単独又は二種以上適宜組み合わせ使用することができ、その使用濃度としては、特に限定されないが、反応液中の濃度が、通常0.0001~10% (w/v)、好ましくは0.001~1% (w/v) の範囲から適宜選択される。

【0031】本発明のLDL-コレステロールの測定法を、2試薬系測定法により実施するには、例えば以下の如く行えばよい。即ち、酸化呈色法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えば両性界面活性剤、CD又は/及びその誘導体、CHE及びカップラー（又はデベロッパ）を、要すれば緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する第一試薬とを混合して生体試料を処理し、2~40℃で1~30分間反応させた後に吸光度 ( $OD_1$ ) を測定する。次いで、該反応液と、

例えばCOD、CHE、POD及びデベロッパ（又はカップラー）、要すれば緩衝剤等を含有する第二試薬とを混合し、2~40℃で1~60分反応させた後に吸光度 ( $OD_2$ ) を測定する。上記の $OD_2$ から $OD_1$ に由来する値（例えば $OD_1$ に補正係数を掛けて求めた値）を差し引いた吸光度 ( $OD_3$ ) を求め、得られた $OD_3$ を、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様に求めて、LDL-コレステロール濃度と $OD_3$ との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。また、紫外部測定法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えば両性界面活性剤、CD又は/及びその誘導体及びCHE、要すれば緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する第一試薬とを混合して生体試料を処理し、2~40℃で1~30分間反応させた後に340nmに於ける吸光度 ( $OD_{1'}$ ) を測定する。次いで、該反応液と、例えばCHD、CHE及びNAD (P)、要すれば緩衝剤等を含有する第二試薬とを混合し、2~40℃で1~60分反応させた後に340nmに於ける吸光度 ( $OD_{2'}$ ) を測定する。上記の $OD_{2'}$ から $OD_{1'}$ に由来する値（例えば $OD_{1'}$ に補正係数を掛けて求めた値）を差し引いた吸光度 ( $OD_{3'}$ ) を求め、得られた $OD_{3'}$ を、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様に求めて、LDL-コレステロール濃度と $OD_{3'}$ との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。

【0032】また、本発明のLDL-コレステロールの測定法は、1試薬系測定法により実施しても良く、この場合は、例えば以下の如く行えばよい。即ち、酸化呈色法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばCHE、COD、POD、被酸化性呈色試薬、両性界面活性剤及び、CD又は/及びその誘導体、要すれば緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する試液とを混合し、2~40℃で1~30分間反応させた後に吸光度 ( $OD_5$ ) を測定する。また、生体試料の代わりに生理食塩水等を使用し、上記と同じ試薬を用い上記と同様の操作を行って盲検値 ( $OD_{B1}$ ) を求める。次いで、 $OD_5$ から $OD_{B1}$ を差し引いた吸光度 ( $OD_R$ ) を求め、これを、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様に求めて、LDL-コレステロール濃度と $OD_R$ との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。また、紫外部測定法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばCHE、CHD、NAD (P)、両性界面活性剤及び、CD又は/及びその誘導体、要すれば緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する試液とを混合し、2~40℃で1~30分間反応させた後に340nmに於ける吸光度 ( $OD_{5'}$ ) を測定する。また、生体試料の代わりに生

理食塩水等を使用し、上記と同じ試薬を用い上記と同様の操作を行って盲検値 ( $OD_{B1}$ ) を求める。次いで、 $OD_s$  から  $OD_{B1}$  を差し引いた吸光度 ( $OD_R$ ) を求め、これを、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度と  $OD_R$  との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。

【0033】本発明のLDL-コレステロール測定用キットは、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、このようなキットとしては以下の如きものが望ましい。即ち、酸化呈色法用の場合、CD又は/及びその誘導体、両性界面活性剤、CHE、及びカップラー（又はデベロッパ）を含んでなる第一試薬と、COD、CHE、POD、及びデベロッパ（カップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものが挙げられる。また、紫外部測定法用の場合、CD又は/及びその誘導体、両性界面活性剤、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHD、NAD(P)、及びCHEを含んでなる第二試薬とを含んでなるものが挙げられる。尚、夫々の構成要素の好ましい態様、具体例については上で述べた通りである。また、当該キットには、必要に応じて、LDL-コレステロール標準品等が組み合わされていても良いことは言うまでもない。

【0034】本発明のLDL-コレステロールの測定法は、両性界面活性剤、及びCD又は/及びその誘導体の共存下で、コレステロールの測定を行わせるために、HDLのみならずVLDL、カイロミクロン等のLDL以外のリポタンパク中のコレステロールとも実質的に反応せず、LDL-コレステロールのみと特異的に反応するので、従来法では困難であったエンドポイント・アッセイでのLDL-コレステロール測定を可能ならしめるものである。また、標準品についてもLDL-コレステロールの純品を用いる必要はなく、コレステロールを含む、標準液あるいは粘度、比重等が正常血清と同様の物性を持つ標準血清を使用することができる。

【0035】以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0036】

【実施例】

実施例1

日立7170形自動分析装置〔(株)日立製作所製〕を使用して、本発明の測定法により、超遠心法で分画した各種リポタンパク中のコレステロールを測定し、その反応性を検討した。

〔試料〕自体公知の超遠心法で血清より分画して得たLDL画分、HDL画分、VLDL画分及びCM画分を試料とした。尚、各試料中のコレステロールを、予め、市

販の総コレステロール測定用試薬キット Lタイプワコー-CHO・H (和光純薬工業(株)製)を用いて、同キットの現品説明書の標準操作法に従い測定した。

〔試薬〕

(試薬1)

R-1; 2, 6-ジ- $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -シクロデキストリン (和光純薬工業(株)製。以下、DM- $\alpha$ -CDと略記する。) 0.06% (w/v)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na塩 (HDAOS: (株)同仁化学研究所製。) 0.6mM、及びNaSO<sub>4</sub> 0.4Mを含有する50mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES)-NaOH緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、CHE (旭化成工業(株)製) 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml、4-AA 3mM及び所定の両性界面活性剤 0.01% (w/v) を含有する50mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

(両性界面活性剤)

20 以下に挙げる両性界面活性剤を夫々使用した。

・リボミンLA (ライオン(株)、商品名); アミノカルボン酸誘導体

・ソフタゾリンLPB-R (川研ファインケミカル(株)、商品名); ラウリン酸アミドプロピルベタイン  
・ソフタゾリンCL (川研ファインケミカル(株)、商品名); 2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン

・アンヒトール24B (花王(株)、商品名); ラウリルベタイン

30 ・エナジコールL-30AN (ライオン(株)、商品名); N-ラウロイル-N-メチル- $\beta$ -アラニンナトリウム

・Zwittergent 3-08 (和光純薬工業(株)、商品名); N-オクチル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸

(試薬2)

R-1; 試薬1と同じ。

R-2; 両性界面活性剤の代わりに、下記の界面活性剤を使用した以外は、試薬1と同じ。

40 (界面活性剤)

・エマルゲンA-90 (花王(株)、商品名); ポリオキシエチレン誘導体

・エマルゲン709 (花王(株)、商品名); ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル

・トリトンX-100 (ローム アンド ハース社、商品名); ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル

(試薬3)

R-1; HDAOS 0.6mM、及びNaSO<sub>4</sub> 0.4Mを含有する50mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、CH  
E (旭化成工業(株)製) 4U/ml、POD (東洋紡(株)  
製。) 6U/ml及び4-AA 3mMを含有する50mM  
PIPES-NaOH緩衝液(pH7.0)をR-2とし  
た。

〔測定条件〕測定パラメータを以下のように設定して、  
各試料中のコレステロールを測定した。

測定方法 ; 2ポイント エンド[16]~[34]

試料量 ; 3  $\mu$ l

\* R-1 ; 270  $\mu$ l

R-2 ; 90  $\mu$ l

測定波長 ; 700/600nm

測定温度 ; 37℃

標準品濃度 ; 100mg/dl

〔結果〕各種試料について得られたコレステロール値  
と、市販のキットを用いて測定した各種試料中のコレ  
ステロール値とを、下記式に当てはめて、各リポタンパク  
の反応率を求めた。

$$\text{反応率 (\%)} = \frac{\text{試料について得られたコレステロール値}}{\text{市販キットを用いて測定したコレステロール値}} \times 100$$

その結果を表1に示す。

【0037】

※【表1】

※【0038】

表1

界面活性剤			各リポタンパクの反応率 (%)			
			LDL	HDL	VLDL	CM
試薬1	リボミンA	両性	94	4	6	4
	ソファグリンLBP-R	両性	101	0	13	5
	ソファグリンCL	両性	100	0	0	2
	ソフビトール24B	両性	98	0	8	3
	エナジコーML-30AN	両性	98	0	11	7
	Zwitter3-08	両性	100	1	9	6
試薬2	イミダゾンA-90	非イオン性	65	54	51	20
	イミダゾン709	非イオン性	86	45	24	25
	トリトンX-100	非イオン性	93	42	0	19
試薬3	界面活性剤無添加 DM- $\alpha$ -CD無添加		103	86	99	98

【0039】表1の測定結果から明らかな如く、試薬1  
を用いた場合、即ち、両性界面活性剤とDM- $\alpha$ -CD  
との共存下でコレステロールの測定を行った場合には、  
LDL以外のリポタンパクは殆ど反応せず、LDL中の  
コレステロールを特異的に測定し得ることが判る。これ  
に対して、非イオン性界面活性剤とDM- $\alpha$ -CDとの  
共存下で測定を行った場合（試薬2）、及び界面活性剤  
とDM- $\alpha$ -CDの何れも非共存下で測定を行った場合

（試薬3）には、LDL以外のリポタンパクとも反応し  
てしまい、LDL-コレステロールを特異的に測定する  
ことは不可能であることが判る。以上のことから、LDL  
中のコレステロールを特異的に測定するためには、両  
性界面活性剤と、CD又は/及びその誘導体との共存下  
でリポタンパク中のコレステロールの測定を行う必要が  
あることが判る。

【0040】実施例2

血清、血漿等生体試料中のLDL-コレステロールの測定を実施するために使用される、測定用キットの代表的な例としては、以下のようなものが挙げられる。

(1) 第一試薬 (pH6~8) : CD又は/及びその誘導体、両性界面活性剤、CHE、カップラー (又はデベロッパ)。

(2) 第二試薬 (pH6~8) : COD、CHE、POD、デベロッパ (又はカップラー)。

[0041]

\*

\*【発明の効果】以上述べた如く、本発明は試料中のLDL-コレステロールを特異的に且つ精度良く測定し得る方法並びにそれに用いられる試薬を提供するものであり、本発明を利用することにより、従来では不可能であったLDL-コレステロールを直接、しかも汎用の自動分析装置を用いて測定し得るという効果を奏するものであるので、斯業に貢献するところ大なる発明である。

【手続補正書】

【提出日】平成9年7月30日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、イオン性化合物、例えばデキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、リンタングステン酸等のポリアニオン等が含まれていても良い。これらは単独または混合して使用することができる。更に、イオン性化合物と、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 等の2価のカチオン (或いはこれら2価のカチオンを生じさせ得る金属塩) とを組み合わせ使用してもよい。これらの使用濃度としては特に限定されないが、イオン性化合物等の使用濃度としては、反応液中の濃度が、通常0.01~10% (w/v) の範囲で使用され、また、2価カチオンの使用濃度としては、反応液中の濃度が、通常0.1~200mMの範囲で使用される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中にはLDL以外のリポタンパク中のコレステロールがコレステロール測定反応に関与することを防止するために、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の1種または2種以上を共存させてもよい。このような目的で使用可能な抗体としては、例えば抗アポリポタンパクA抗体、抗アポリポタンパクC抗体、抗アポリポタンパクE抗体、抗 $\alpha$ リポタン※

※バク抗体等が挙げられる。これら抗体の使用濃度としては、LDL以外のリポタンパク中に含まれるコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを防止し得る濃度以上であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001~10mgAb/ml、好ましくは0.01~1mgAb/mlとなるように反応液中に添加される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、この分野に於いて通常用いられる界面活性剤、例えばポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等の非イオン性界面活性剤、例えば塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウム等の陽イオン性界面活性剤、例えばコール酸、デオキシコール酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤等、両性界面活性剤以外の界面活性剤が含まれていても良い。これらは単独又は二種以上適宜組み合わせ使用することができ、その使用濃度としては、特に限定されないが、反応液中の濃度が、通常0.0001~10% (w/v)、好ましくは0.001~1% (w/v) の範囲から適宜選択される。

フロントページの続き

(72)発明者 花田 寿郎

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内